

A1

**DEMANDE  
DE BREVET D'INVENTION**

(21)

**N° 73 25766**

(54) Protéines et peptides ayant une activité tuberculinique, extraits des cellules de bacilles tuberculeux et leur procédé de préparation.

(51) Classification internationale (Int. Cl.<sup>2</sup>). A 61 K 37/02; C 07 C 103/52; C 07 G 7/00.

(22) Date de dépôt ..... 13 juillet 1973, à 14 h 43 mn.

(33) (32) (31) Priorité revendiquée :

(41) Date de la mise à la disposition du  
public de la demande ..... B.O.P.I. — «Listes» n. 16 du 18-4-1975.

(71) Déposant : Société dite : MITSUI PHARMACEUTICALS, INCORPORATED, résidant au Japon.

(72) Invention de :

(73) Titulaire : *Idem* (71)

(74) Mandataire : Cabinet Lavoix, 2, place d'Estienne-d'Orves, 75441 Paris Cedex 09.

La présente invention est relative à des protéines et peptides  
5 tuberculiniques purs possédant comme groupe fonctionnel actif l'en-  
chaînement d'acides aminés - Asp-Gly-Sér-Glu-Mét-,

Il est bien connu que les dérivés protéiniques purifiés (DPP)  
provenant de tuberculine vieillie (TV) extracellulaire ont servi  
exclusivement jusqu'à présent au diagnostic de la tuberculose.  
10 Malheureusement en plus de la protéine tuberculinique, les DPP  
contiennent d'autres protéines inactives, des acides nucléiques,  
des polysaccharides et des acides gras. Etant donné que les proté-  
ines de la tuberculose n'ont pas été obtenues à l'état pur, leurs  
propriétés physico-chimiques et les séquences de leurs acides ami-  
15 nés n'ont pas été déterminées.

La demanderesse a réussi à isoler des protéines de la tubercu-  
line à partir de cellules de bacilles tuberculeux et les ont obte-  
nues sous des formes cristallines. Les séquences d'acides aminés  
des protéines tuberculiniques cristallines ont pu ainsi être déter-  
20 minées. En outre, les peptides actifs ont été obtenus par hydrolyse  
des protéines tuberculiniques cristallines.

Les résultats des recherches ont montré que l'activité tuber-  
culinique est étroitement liée au groupe fonctionnel indiqué exis-  
tant au sein des protéines et des peptides.

25 Les protéines tuberculiniques selon l'invention sont préparées  
à partir des cellules de bacilles tuberculeux par traitement avec  
un solvant organique pour obtenir des protéines hydrosolubles. Les  
protéines actives sont purifiées principalement sur diéthyl-amino-  
éthyl (DEAE) cellulose et séphadex par chromatographie sur colonne.

30 Les produits de départ utilisés dans l'invention sont obtenus  
à partir de souches de Mycobacterium tuberculosis du type humain,  
bovin et aviaire, comprenant le BCG et d'autres. La protéine tuber-  
culinique cristalline extraite de la souche Aoyama B de Mycobacte-  
rium tuberculosis de type humain est composée de 89 résidus d'aci-  
35 des aminés par molécule (9.700 g). D'autre part, la protéine active  
du BCG est composée de 135 résidus d'acides aminés par molécule  
(13.500 g). Les protéines tuberculiniques susceptibles d'être obte-  
nues dépendent des matières de départ utilisées dans le procédé  
selon l'invention.

40 Les solvants organiques employés pour la purification sont

l'acétone, le méthanol ou l'acide acétique. On se sert également d'un autre solvant organique comme une cétone, un alcool ou un acide carboxylique. Bien entendu, ces solvants peuvent être utilisés avec de l'eau.

- 5 Les produits dépourvus de constituants liposolubles sont dialysés contre des tampons à pH 5,5 - 7,8, comme le tampon tris (hydroxyméthyl) aminométhane-acide chlorhydrique, à pH 7,0 comme un tampon acide éthylène diamine tétracétique, ou phosphate disodique/phosphate monopotassique, à pH 7,2 à base d'acide éthylène  
10 diamine tétracétique, etc.

Les protéines dialysées sont purifiées par chromatographie sur colonne, ou électrophorèse bidimensionnelle sur papier sous haute tension suivie de chromatographie sur papier. On utilise de préférence la chromatographie sur colonne ou la filtration sur gel, avec  
15 des colonnes de DEAE cellulose, d'aminoéthyl (AE) cellulose, d'ECTEOLA-Cellulose, de Sephadex G-150 ou G-200. Les protéines dialysées sont éluées avec les tampons mentionnés plus haut.

Les protéines tuberculiniques cristallines selon l'invention sont solubles dans l'eau et leur poids moléculaire, compris entre  
20 3.000 et 35.000 dépend des produits de départ. Les tests tuberculiniques cutanés indiquent que les protéines de la tuberculine selon l'invention sont 100 fois plus actives que les DPP sur cobayes sensibilisés par une souche tuée par la chaleur de Mycobacterium tuberculosis de type Aoyama B ou BCG.

- 25 Les peptides tuberculiniques selon l'invention sont préparés en hydrolysant les protéines tuberculiniques cristallines et obtenus par fractionnement chromatographique de ces hydrolysats.

L'hydrolyse des protéines peut se faire par voie chimique ou enzymatique. L'hydrolyse chimique s'effectue avec un acide minéral.

- 30 On conduit l'hydrolyse enzymatique avec une enzyme protéolytique comme la trypsine, la chymotrypsine, la pepsine, la papaïne, les protéinases bactériennes, la carboxypeptidase A ou B, etc.

Les hydrolysats obtenus sont fractionnés par chromatographie sur colonne ou sur papier, par électrophorèse sur papier sous haute  
35 tension, par filtration sur gel, etc.

La filtration sur gel est effectuée par élution avec un tampon à pH 5,9 à l'acétate d'ammonium sur Sephadex G-25 ou CM-Sephadex, un tampon à pH 4,5 à l'acétate d'ammonium sur SE-Sephadex C-50 ou un tampon à pH 3,1 à la pyridine et à l'acide acétique sur Dowex 50-X2  
40 ou 1-X2.

Les peptides tuberculiniques selon l'invention sont des solides cristallins blancs solubles dans l'eau, de poids moléculaire compris entre 500 et 3.000 environ.

Les tests tuberculiniques cutanés indiquent que ces peptides selon l'invention présentent une partie appréciable de l'activité des DPP sur cobayes sensibilisés avec une souche tuée par la chaleur de Mycobacterium tuberculosis de type Aoyama B ou BCG.

Les exemples suivants illustrent le procédé de préparation et de purification des protéines et des peptides de la tuberculine selon l'invention.

#### Exemple 1.

On tue des cellules (100 g) de culture de Mycobacterium tuberculosis de souche Aoyama B, par chauffage à 120°C pendant 30 minutes. On sépare les cellules du milieu de culture par filtration, on les désintègre par traitement ultrasonore et on traite le mélange à l'acétone. On dialyse le résidu obtenu contre un tampon à pH 7,0 à base de tris (hydroxyméthyl) amino méthane et d'acide chlorhydrique à la concentration 0,001M, contenant de l'acide diamine et de l'acide tétracétique, à la concentration 0,0001M.

On chromatographie les résidus dialysés sur colonne de DEAE-cellulose. On effectue l'élution dans un gradient de chlorure de sodium. Pratiquement toute l'activité tuberculinique se trouve dans la seconde fraction de protéines. On réalise une nouvelle chromatographie sur Sephadex G-200 dans le même tampon que précédemment et on sépare les éluats en trois fractions.

On trouve presque tout le produit actif dans la fraction protéique principale. Le produit actif cristallise spontanément quand on conserve la solution à 4°C dans la solution du même tampon mélangée à de l'acétone purifiée.

A partir de 100 g de cellules (poids humide) de la souche Aoyama B mentionnée, on obtient 20 mg de protéine tuberculinique cristallisée. Cette protéine est composée de 89 résidus d'acides aminés et la séquence de ces acides est déterminée comme il suit :

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
35	H <sub>2</sub> N-	Arg-	Leu-	Leu-	Asp-	Asp-	Thr-	Pro-	Glu-	Val-	Lys- ...
	27	68		70	71	72	73	74		88	89
	Cys...	Cys...	Asp-	Gly-	Ser-	Glu-	Met...	Ala-	Lys-	COOH	

Le test tuberculinique cutané montre que cette protéine tuberculinique est 100 fois plus active que celle des DPP sur cobayes sensibilisés par une souche tuée par la chaleur du type Aoyama B

ou BCG.

Exemple 2.

En suivant le procédé décrit à l'exemple 1, on prépare de même, à partir de BCG, la protéine tuberculinique active de poids moléculaire voisin de 13,500.

La séquence des acides aminés de cette protéine tuberculinique composée de 135 résidus d'acides aminés a été déterminée. Les acides aminés N-terminaux et C-terminaux ainsi que la structure primaire sont essentiellement identiques à ce qui a été trouvé dans la protéine extraite de la souche Aoyama B tuée par la chaleur.

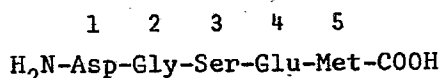
Le test cutané tuberculinique indique que cette protéine tuberculinique a une partie appréciable de l'activité tuberculinique de la souche Aoyama B tuée par la chaleur, sur les cobayes sensibilisés avec des souches tuées par la chaleur du type Aoyama B ou BCG.

15 Exemple 3.

On soumet la protéine tuberculinique cristallisée obtenue à l'exemple 1 à une hydrolyse enzymatique à 37°C pendant 6 h, avec une solution de trypsine à 1 % à pH 8,4.

On soumet les hydrolysats résultants à une électrophorèse bidimensionnelle sur papier sous haute tension, en opérant sur papier Whatman, avec un champ de 75 V/cm, dans un tampon à pH 4,5 pyridine-acétate, et on fait ensuite une chromatographie sur papier avec le mélange butanol-acide acétique-eau (4 ; 1 : 4, en volume).

On parvient ainsi à séparer plusieurs peptides actifs. L'un d'eux est un pentapeptide ayant la séquence d'acides aminés ci-après :



Un autre de ces peptides est un oligopeptide de poids moléculaire voisin de 950.

Les tests tuberculiques cutanés montrent que ces peptides ont des activités tuberculiques correspondant à 1-10 % de celle de la protéine tuberculinique de départ.

Exemple 4.

35 On hydrolyse la protéine tuberculinique cristallisée obtenue à l'exemple 1, en la traitant par une solution de chymotrypsine à 0,5 %. On chromatographie les hydrolysats sur colonne de Sephadex G-25, en éluant avec un tampon à l'acétate d'ammonium à pH 5,9.

Les peptides tuberculiques actifs ainsi obtenus sont fractionnés 40 complémentaiement sur colonne de Dowex 1-X2 avec un tampon

pyridine-acide acétique à pH 3,1.

Le pentapeptide tuberculinique ainsi obtenu est le même que dans l'exemple 3.

Exemple 5.

- 5 On traite comme précédemment la protéine tuberculinique obtenue à l'exemple 2 et on obtient le même pentapeptide tuberculinique qu'à l'exemple 3.

# REVENDICATIONS

1. Composés constitués par des protéines ou des peptides ayant une activité tuberculinique, possédant comme groupe fonctionnel actif l'enchaînement peptidique suivant - Asp-Gly-Ser-Glu-Met-
- 5 2. Protéine à activité tuberculinique selon la revendication 1 caractérisée par un poids moléculaire compris entre 3.000 et 35.000.
3. Peptide à activité tuberculinique selon la revendication 1 caractérisé par un poids moléculaire compris entre 500 et 3.000.
- 10 4. Protéine à activité tuberculinique obtenue à partir d'une souche de Mycobacterium tuberculosis de type humain, Aoyama B, caractérisée en ce qu'elle est composée de 89 résidus d'acides aminés dont la séquence est la suivante :
 

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
15	H <sub>2</sub> N-Arg-Leu-Leu-Asp-Asp-Thr-Pro-Glu-Val-Lys-...								
	27	---	68	70	71	72	73	74	88 89
	Cys..Cys..Asp-Gly-Ser-Glu-Met..Ala-Lys-COOH								
5. Protéine à activité tuberculinique obtenue à partir du BCG, caractérisée en ce qu'elle est composée de 135 résidus d'acides
- 20 d'aminés et ce que les acides aminés N-terminaux et C-terminaux et la structure primaire sont essentiellement les mêmes que dans la protéine selon la revendication 4.
6. Pentapeptide à activité tuberculinique caractérisé par un poids moléculaire de 505 et la séquence d'acides aminés :
 

25	1	2	3	4	5
	H <sub>2</sub> N-Asp-Gly-Ser-Glu-Met-COOH				
7. Nonapeptide tuberculinique actif de poids moléculaire voisin de 950.